

## ⑫公開特許公報(A)

昭54-113417

⑬Int. Cl.<sup>2</sup>  
A 61 K 9/00識別記号 ⑭日本分類  
30 C 4府内整理番号 ⑮公開 昭和54年(1979)9月5日  
7057-4C発明の数 5  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

## ⑯リポゾームデリバリーシステム

アメリカ合衆国ニュージャージ

⑰特 願 昭54-7307

イ州07950モリス・プレインズ

⑱出 願 昭54(1979)1月26日

・カントリーウッドドライブ28

優先権主張 ⑲1978年1月27日⑳米国(US)  
⑳872835

⑲出願人 サンド・アクチエンゲゼルシャ

㉑發明者 ローレン・アロイシアス・ケリ

フト

㉒代理人 弁理士 小田島平吉

スイス国バーゼル(番地なし)

## 明細書

## 1. 【発明の名称】

リポゾームデリバリーシステム。

## 2. 【特許請求の範囲】

1. ステロール及び水中でミセルを形成することができる脂肪族脂質を含有するリポゾーム内に薬物が包み込まれている、リポゾーム薬物デリバリーシステム。

2. ステロールがコレステロール、 $\beta$ -ヒドロキシステロール、デスマステロール、7-ケト-コレステロール、 $\beta$ -コレスタンール又はエストラジオールである、特許請求の範囲第1項記載のデリバリーシステム。

3. ステロールがコレステロール又は $\beta$ -ヒドロキシステロールである、特許請求の範囲第2項記載のデリバリーシステム。

4. 脂肪族脂質が $C_{16}$ ~ $C_{18}$ 飽和又は不飽和脂肪

酸のナトリウム塩又はカリウム塩である、特許請

求の範囲第1~8項のいずれかに記載のデリバリ

ーシステム。

5. 脂肪族脂質が $C_{16}$ ~ $C_{18}$ 不飽和脂肪酸のナトリウム又はカリウム塩である特許請求の範囲第4項記載のデリバリーシステム。

6. ステロールがコレステロールでありそして脂肪族脂質がオレイン酸ナトリウム又はカリウムである、特許請求の範囲第1項記載のデリバリーシステム。

7. 薬物がインシユリンである、特許請求の範囲第1~6項のいずれかに記載のデリバリーシステム。

8. 薬物が麦角アルカロイドである特許請求の範囲第1~7項のいずれかに記載のデリバリーシステム。

9. 脂肪族脂質、ステロール及び水の重量割合

音波処理が与える。

複雑な脂質を使用することなく薬剤を包み込むことができるリポソームを製造しうることが見出された。脂質の代わりに、水中でミセルを形成することができる脂肪族脂質が使用される。

従つて、本発明は、ステロール及び水中でミセルを形成しうる脂肪族脂質を含有するリポソーム内に薬物が包み込まれているリポソーム薬物デリバリーシステムを提供する。

脂肪族脂質は、臨界ミセル濃度(CMC)以上の濃度で存在する場合水性媒体中でミセルを形成する任意の薬学的に許容しうる脂肪族表面活性化合物であることができる。ミセルとは水性媒体中の界面活性剤分子のコロイド的大きさの集合物であつて、その中ににおいて分子が親水性末端を外側にし親油性末端を内側にして配向しているものである。好ましくは、脂肪族脂質はC<sub>6</sub>~C<sub>18</sub>飽和又

は不飽和脂肪酸のナトリウム又はカリウム塩であ

る。適当な酸は脂肪酸、イソ吉草酸、カブロン酸、カブリル酸、カブリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸及びリノレン酸である。塩はより好ましくは不飽和脂肪酸の塩、とくに14~18の炭素原子の不飽和脂肪酸の塩である。オレイン酸ナトリウム及びカリウムがとくに好ましい。

ステロールは、上記脂肪族脂質とリポソームを形成する能力がある任意の薬学的に許容できるステロールである。好ましいステロールはコレステロール、 $\beta$ -シットステロール、デスマステロール、 $\alpha$ -ケト-コレステロール、 $\beta$ -コレスタンール及びエストラジオール、とくにコレステロール及び $\beta$ -シットステロールである。

包み込まれる(to be encapsulated)薬物の性質は重要でない。適当な薬物はワクチン及び抗

原、並びに薬剤を含む。適当な媒剤はホルモン、例えばインシクリン、愛角アルカロイド、例えばジヒドロエルゴトキシン、ジヒドロエルゴタミン及びブロモクリプチン(bromocryptine)並びにアノレティックス(anorectics)、例えばマジンドール(mazindol)を含む。

本発明はまた

a) ステロールの固体結晶を脂肪族脂質及び薬物の水性ミセル溶液と接触させ、生成する液晶を超音波照射によりリポソームに転換するか、

b) ステロールを、脂肪族脂質及び薬物を含む水性媒体と水と混和しうる溶媒との混合物中に溶解し、溶媒を蒸発させるか、又は

c) ステロール及び薬物を普通の溶媒に溶解し、溶媒を蒸発させ、残渣を脂肪族脂質の水性ミセル溶液と接触させ、生成する液晶を超音波照射によりリポソームに転換する、

リポソームデリバリーシステムの製造方法を提供する。

プロセス態様①においては、ステロール結晶を60℃までの温度、好ましくは20~50℃、より好ましくは25~45℃の温度でミセル溶液と接触させる。ミセルによるステロール結晶の侵透(penetration)は2~60分を要し、超音波処理(sonication)は、侵透が完了しそして液晶システムが形成された後にのみ行うべきである。

プロセス態様②においては、水混和性溶媒は適当にはアセトン、ジオキサン又はC<sub>1</sub>~<sub>4</sub>アルコールである。ステロールは攪拌しながら60℃までの温度で、好ましくは20~50℃の温度で溶解する。水混和性溶媒の蒸発は超音波照射を要することなく液晶をリポソームに変える。

プロセス態様③は、包み込まれる薬物が脂肪族脂質の水性ミセル溶液に溶解しない場合に適し

うるから、経口投与が好ましい。経口投与について、リポゾーム懸濁液は薬理的に許容できる希釈剤又は担体及びフレーバーリング (flavouring) 及び着色剤のような通常の補葉と混合することができ、そしてシロップ、エリクシル、カプセル等の形で投与することができる。非経口的投与の場合、濃縮又は単離したリポゾームは適当な担体液体、例えば殺菌蒸留水又は生理的食塩水溶液中に懸濁することができる。坐葉投与を使用することもできる。

以下の例は本発明を例示する。

#### 実施例 1

二つの成度の牛のインシユリン溶液を調製した。

1) 2500国際単位 (IU) すなわち  
102.9 mg (比活性 (specific activity)=  
24.8 単位/mg) を 16% ルオレイン酸ナトリウム水溶液 5 ml に溶解した。

2) 又 1250 国際単位すなわち 51.45 mg

(比活性 = 24.8 単位/mg) を 16% ルオレイン酸ナトリウム水溶液 5 ml に溶解した。

インシユリン調製物(1)及び(2)の各々をコレステロール 2.0 mg を含有する 1.0 ml のビーカーに移した。コレステロール 2.0 mg をクロロホルム 1.0 ml C 溶解し、次いでその溶液の 1 mg を 1.0 ml のビーカーに入れ、室温下室温で溶媒を除去することによつてコレステロールを調製した。各々のビーカーを遠赤でフラッシュし、プラスチックライムで被覆し、87°C の水浴中に入れ、1時間温かく振とうしコレステロール結晶を浸透させた。ついで液晶懸濁液をビオソニック IV ウルトラソニクシエトレー (ブランウイル) (Biosonic IV Ultrasonic Generator(Brownwill)) で直角 4 mm のプローブを用いて 2 回 1 分間超音波処理 (sonication) した。ビーカーは超音波処理の間

氷のバケツ中に置いた。超音波処理後、リポゾーム含有システムの最終組成は、

組成物 A) 500 IU/ml インシユリン =  
20.9 mg/ml  
コレステロール = 4 mg/ml  
オレイン酸ナトリウム = 1.6 mg/ml

組成物 B) 250 IU/ml インシユリン =  
10.4 mg/ml  
コレステロール = 4 mg/ml  
オレイン酸ナトリウム = 1.6 mg/ml

であつた。

リポゾーム組成物 A) 及び B) の懸濁液を、投与される体重 1.0 g 当り懸濁液 0.1 ml の割合で、経口的にマウスに与えた。これは組成物 A) の 5000 IU/kg 又は組成物 B) の 2500 IU/kg に相当する。

牛の胰臍インシユリン (シグマケミカル (Sigma Chemical)) のように、組成物 A) を注射 (i. m.)

のために 1 : 10 に希釈し、そして 10 IU/kg で投与した。

2 時間及び 4 時間後、8.5 mg/kg のヘキソバニヒタールナトリウム (i. p.) で麻酔しそして心臓穿刺により血液を集めることによつてこの動物を犠牲にした。集めた血液をヘパリン 0.025 ml、1000 単位/ml を含有するオートアナライザーカップ (Auto Analyzer Cup) 中に入れた。血液試料にふたをし、振とうし、そして水バケツ中に保存した。オートアナライザーフェリシアン化カリウム法 (N - 26°C) よりグルコースを測定した。

p. o. ルートで与えても i. m. ルートで与えても、カルボキシメチルセルロースは血中グルコースに対して何の影響も与えなかつた。証つて、試験物質は、p. o. 又は i. m. で与えても、カルボキシメチルセルロース対照物と関係付けることができる。

本発明のリポゾーム中のインシュリン5000IU/kgを経口投与後4時間で血中グリコース量の明らかな低下がみられる。i.m.ルートにおいて、10IU/kgでリポゾームに包み込んだインシュリンは包み込んでいないインシュリンに相当する活性を有していた。このことは、インシュリンをリポゾームに入れることによりインシュリン活性が影響を受けないことを示す。

組成物A)のリポゾームをまた、ワイスマン等 (Weissmann, G., et al.), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 88-92 (1975); セツサ及ワイスマン (Sessa, G. & Weissmann, G.), J. Biol. Chem. 245, 8295-8301 (1971); ワイスマン、ブランド及びフランクリン (Weissmann, G., Brand, A. & Franklin, E. C.), J. Clin. Invest. 58, 586-548 (1974), 及びワイスマン及

びリタ (Weissmann, G. & Rita, G. A.), Nature 240, 167-172 (1972) の記載に従つて、牛のインシュリン500IU/kgの存在下に製造した正及び負の両方に帯電しているレシチン-コレステロールリポゾームと比較した。

本発明のリポゾーム及びレシチンリポゾームは共にマウスで試験し、上記のように分析した。

結果を第Ⅲ表に示す。

第Ⅲ表

血中グルコース (MG/100ML)					
処理	ルート	2時間後	%△	4時間後	%△
対照 カルボキシメチル セルロース	p.o.	112.0 ±5.9	---	92.7 ±6.7	---
A) 5000IU/kg	p.o.	47.6 ±10.8	58↓ $P < 0.01$	70.2 ±8.7	24↓ $P = N.S.$
L.C. (+) 5000IU/kg	p.o.	105.8 ±1.8	17↓ $P = N.S.$	92.8 ±5.8	0 $P = N.S.$
L.C. (-) 5000IU/kg	p.o.	88.9 ±2.6	21↓ $P < 0.05$	81.5 ±1.25	1↓ $P = N.S.$
A) 5IU/kg	i.m.	24.8 ±2.5	78↓ $P < 0.001$	21.0 ±2.7	77↓ $P < 0.001$
L.C. (+) 5IU/kg	i.m.	81.8 ±2.6	72↓ $P < 0.001$	24.8 ±3.1	74↓ $P < 0.001$
L.C. (-) 5IU/kg	i.m.	29.0 ±3.5	74↓ $P < 0.001$	18.8 ±1.6	8.0↓ $P < 0.001$

図面の添書(内容に変更なし)

assay)を行つた。該方法はジヒドロエルゴトキシン含有溶液とファンクター試薬の等量を混合し、

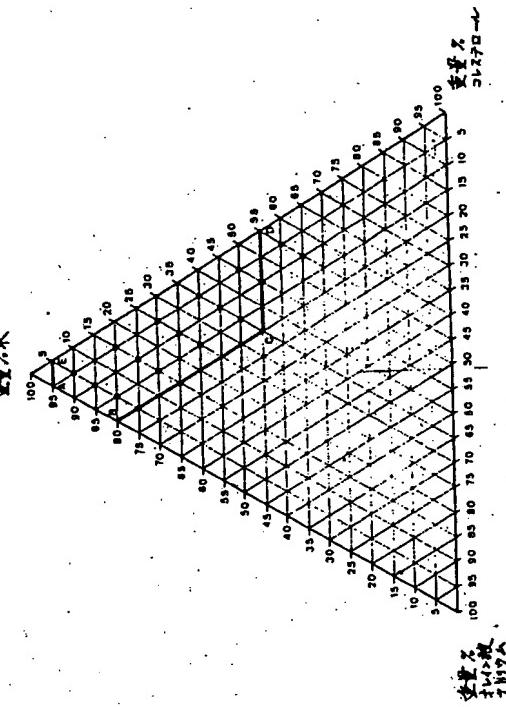
80分間放置し、沪過しそして550nmでのこの溶液の吸収度を標準ジヒドロエルゴトキシンとファンクター試薬の混合物の吸収度と比較する方法である。ファンクター試薬は、蒸留水700mlと硫酸銅1800mgの混合物中にp-ジメチルアミノベンズアルデヒド2.5gを溶解し、5%塩化第1鉄溶液4mlを加え、そして蒸留水により2リットルとすることにより調製する。

結果は、自由フラクション中のジヒドロエルゴトキシン濃度に変化がないことを示した。このことはジヒドロエルゴトキシンの少くともある部分がリボゾーム中に包み込まれていたことを示す。

## 4. [図面の簡単な説明]

第1図は三成分システム、オレイン酸ナトリウム/コレステロール/水の状態図である。

FIG. 1



## 手 続 補 正 書(方式)

昭和54年2月28日

特許庁長官　森 谷 勝 二 殿

## 1. 事件の表示

昭和54年特許願第7807号

## 2. 発明の名称

リボゾームデリバリー・システム

## 3. 補正をする者

事件との関係　特許出願人  
住所　スイス・ヨーロッパ(著地なし)

名　称　サンド・アクチエンゲルシャフト  
(氏名)

## 4. 代理人　人　テ107

住 所　東京都港区赤坂1丁目9番15号  
日本自動車会館  
氏 名　(607)弁理士 小 田 高 幸  
生 所  
氏 名

なし

## 5. 補正命令の日付　昭和54年2月28日

## 6. 補正の対象　図面　2月23日

## 7. 補正の内容

別紙の通り  
図面の添書(内容に変更なし)